



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1668号
学位記番号	第1185号
氏名	韓 樹森
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	<p>Improved Clonality Detection in Hodgkin Lymphoma Using a Semi-nested Modification of the BIOMED-2 PCR Assay for IGH and IGK Rearrangements: A Paraffin-embedded Tissue Study (ホジキンリンパ腫における単クローン性の検出：semi-nested BIOMED-2 multiplex PCR 法の有用性)</p> <p>Pathol Int. 2018;68:287-293</p>
論文審査担当者	<p>主査： 高橋 智 副査： 山崎 小百合, 稲垣 宏</p>

論文内容の要旨

Hodgkin リンパ腫(HL)は、少量の散在する大きな腫瘍細胞(単核のホジキン細胞と多核の Reed-Sternberg 細胞)と非腫瘍性でヘテロな炎症性および付随性細胞の混合により特徴付けられる。HL の多くは B 細胞由来と考えられ、IGH 遺伝子はクローナルに再構成している。HL の病理学的診断は、リンパ節外の発生、小さな生体組織サイズ、組織学に T 細胞リンパ腫と類似などのため、また HL の変則的な表面形質発見によって、HL の診断はしばしば困難である。新鮮腫瘍組織が入手可能な場合は稀で、ほとんどの追加検索は、ホルマリン固定パラフィン包埋検体によって実行しなければならない。BIOMED-2 IGH/IGK PCR プロトコルでは、パラフィン標本を用いて、多くの B 細胞性腫瘍のクロナリティを検出できる。しかし、HL への BIOMED-2 プロトコルは広く応用されていない。パラフィン組織を用いた研究は少数で、その検出率は、日常診療に応用できるほど高くない。我々は以前、B 細胞性リンパ腫において、BIOMED-2 IGH-PCR プロトコルに semi-nested 法を加えることが、クロナリティ検出率向上に有用であることを報告した。

本研究においては、我々は新たに semi-nested BIOMED-2 IGK-PCR プロトコルを考案し、クロナリティ解析に、semi-nested BIOMED-2 IGH および IGK-PCR プロトコルを用いることが可能となった。58 例の古典的 HL パラフィン包埋組織に対して、IGH および IGK 遺伝子を標的とした 1)標準プロトコル法、2)再増幅プロトコル法および 3)semi-nested プロトコル法を用いてクロナリティ解析を行った。semi-nested プロトコル法は、標準法や再増幅プロトコル法より有意に高いクロナリティ検出率を示した：標準的プロトコル法により 13/58 (22.4%)例の HL 症例でクロナリティが検出されたのに対して、semi-nested プロトコル法では 38/58(65.5%)例で検出された。クロナリティ検出率と、HL 亜型、CD30 陽性細胞密度、CD20 陽性細胞密度、また EB ウイルス感染との関連はなかった。

以上より、semi-nested BIOMED-2 IGH/IGK PCR プロトコルにより、パラフィン包埋切片を使って、古典的 HL 症例の約 2/3 でクロナリティを検出が可能であった。病理組織学的 HL が疑われていつ症例において、標準的 IGH/IGK 解析ではクロナリティを検出することができなかった場合、semi-nested プロトコル法は病変のクロナリティ検出に有用である。

論文審査結果の要旨

【はじめに】Hodgkin リンパ腫(HL)の多くはB細胞由来と考えられ、ほとんどの症例で *IGH* 遺伝子はクローナルに再構成している。HL の病理学的診断は、リンパ節外の発生、小さな生体組織サイズ、組織学にT細胞リンパ腫との類似などのため、またHLの変則的な表面形質発現によって、HLの診断はしばしば困難である。新鮮腫瘍組織が入手可能な場合は稀で、ほとんどの追加検索は、ホルマリン固定パラフィン包埋検体によって実行しなければならない。BIOMED-2 *IGH/IGK*-PCR プロトコルでは、パラフィン標本を用いて、多くのB細胞性腫瘍のクロナリティを検出できる。しかし、HLへは広く応用されていない。パラフィン組織を用いた研究は少数で、その検出率は、日常診療に応用できるほど高くない。我々は以前、B細胞性リンパ腫において、BIOMED-2 *IGH*-PCR プロトコルに semi-nested 法を加えることが、クロナリティ検出率向上に有用であることを報告した。

【目的】新たに semi-nested BIOMED-2 *IGK*-PCR プロトコルを考案し、クロナリティ解析に、semi-nested BIOMED-2 *IGH/IGK*-PCR プロトコルを用いることで、HLにおけるクロナリティ検出率向上が得られるか検討した

【方法】58例の古典的HLパラフィン包埋組織に対して、*IGH*および*IGK*遺伝子を標的とした1)標準プロトコル、2)再増幅プロトコルおよび3)semi-nestedプロトコルを用いてクロナリティ解析を行った。

【結果】semi-nested *IGH/IGK*-PCR プロトコルは、標準法や再増幅プロトコルより有意に高いクロナリティ検出率を示した：標準的プロトコルにより13/58(22.4%)例のHL症例でクロナリティが検出されたのに対して、semi-nestedプロトコルでは38/58(65.5%)例で検出された。クロナリティ検出率と、HL亜型、CD30陽性細胞密度、CD20陽性細胞密度、またEBウイルス感染との統計的関連は得られなかった。

【結語】semi-nested BIOMED-2 *IGH/IGK*-PCR プロトコルにより、パラフィン包埋切片を使って、古典的HL症例の約2/3でクロナリティを検出が可能であった。病理組織学的にHLが疑われている症例において、標準的 *IGH/IGK* 解析ではクロナリティを検出することができなかった場合、semi-nestedプロトコル法は病変のクロナリティ検出に有用である。

【審査の内容】主査の高橋より、得られたクローナルバンドの塩基配列は確認したか、BIOMED-2 *IGL*-PCR プロトコルを検討したか、など7項目、第一副査の山崎教授より、semi-nested PCR 実験手技について、本プロトコルの他の血液腫瘍への応用について、など6項目の質問がなされた。そして第二副査の稲垣教授からは、HLの歴史、HLについて欧米と本邦の疫学的差異、治療・予後など5項目の質問がなされた。質問に対して回答に窮する場面もあったが、概ね適切な回答が得られ、申請者は学位論文の趣旨を理解し専門領域の知識も有しているものと判断した。本研究は、semi-nested BIOMED-2 *IGH/IGK*-PCR プロトコルがHLにおいてクロナリティ検出率向上に有用であることを示した。HLは時に病理診断が困難であるが、この腫瘍診断に対する実用に耐えられるクロナリティ解析法は日常診療に有用である。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。